

H. Knaepler¹, F. Koch¹, H. Bugany²

Klinik für Unfallchirurgie¹ (Leiter: Prof. Dr. L. Gotzen) und Institut für Virologie² (Leiter: Prof. Dr. H.-D. Klenk) der Philipps-Universität Marburg

Untersuchungen zur HIV-Inaktivierung in allogenen Knochentransplantaten durch chemische Desinfektion und radioaktive Bestrahlung

Mit einem Zweikammerdiffusionssystem wurde untersucht, ob eine 70 % ige wäßrige Äthanollösung nach einer Diffusion von 24 Stunden durch Spongiosascheiben mit einer Schichtdicke von 3 mm bzw. 6 mm eine HIV-Suspension inaktivieren konnte. In beiden Fällen blieb HIV infektiös und konnte in Zellkulturen angezüchtet werden. Weitere Versuche mit gaschromatographischen Analysen belegten die schlechte Diffusionsfähigkeit des Äthanol durch humane Spongiosa. Zur Bestimmung der Strahlenresistenz wurden HIV-Suspensionen verschiedenen Dosierungen ionisierender Strahlung ausgesetzt. Nach einer Applikation von 15 kGy erfolgte keine Infektion der Zellkulturen mit HIV. Die mit 2, 7 und 10 kGy behandelten HIV-Suspensionen führten dagegen zu einer Virusproduktion in den Zellkulturen.

Experimental studies on HIV inactivation in allogeneous bone transplants by chemical disinfection and irradiation

In our study we examined bone disinfection by ethanol and by irradiation. A 70 % aqueous ethanol solution diffused through a 3 mm and a 6 mm slice of human cancellous bone against 2 ml of a HIV-sample (RTA: 300 000 cpm/ml) for 24 hours. In both cases HIV could not be inactivated. Infected T-lymphocyte cultures showed specific morphological cell changes. The Abbott HIV-antigen-EIA proved the treated HIV-samples to be infectious after cultivation in macrophage-cultures. Additional gaschromatographical measurement of ethanol diffusion through 3 mm and 6 mm of human cancellous bone supported these observations: a 70 % aqueous ethanol solution achieved a concentration of 25.6 % (18.0 %) in median after 24 hours and a thickness of 3 mm (6 mm). The effect of different doses of irradiation on HIV-samples (RTA: 300,000 cpm/ml) was examined. The samples were irradiated with 2, 7, 10, 15 and 25 kGy to determine the appropriate dose for inactivation. Irradiation with 15 kGy caused HIV inactivation since no virus production could be detected in the macrophage culture (Abbott HIV-antigen-EIA). The samples irradiated with 2, 7 and 10 kGy were still infectious.

Einführung

Die allogene Knochentransplantation besitzt in der modernen Knochenchirurgie ein breites Anwendungsfeld. Nach eigenen Untersuchungen werden in der Bundesrepublik jährlich etwa 15 000 allogene Knochentransplantationen durchgeführt. Die Indikationen erstrecken sich von der Überbrückung bei frischen oder pseudarthrotischen Knochendefekten bis zur Defekt-

auffüllung nach der Entfernung von Knochentumoren. Der entscheidende Vorteil insbesondere gegenüber der autogenen Knochentransplantation besteht in der freien Verfügbarkeit des allogenen Knochenmaterials.

Die Transplantation von Knochen hat in der experimentellen wie in der klinischen Forschung eine lange Tradition. So führte Macewen bereits 1880 die erste allogene Knochentransplantation durch [11]. Eine Anwendung in größerem Umfang wurde erst möglich, nachdem eine Methode zur Verfügung stand, mit der Knochen über längere Zeit ohne Qualitätsverlust gelagert werden konnte. 1942 schlug Inclán die Tiefkühlung zur Knochenkonservierung vor [8]. Fünf Jahre später stellte

Mit freundlicher Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Eingang des Manuskripts: 21. 6. 1990.

Annahme des Manuskripts: 5. 7. 1990.

Bush sein Konzept einer „bone bank“ vor und führte damit diesen Begriff in die Geschichte der allogenen Knochentransplantation ein [2].

Das Betreiben einer Knochenbank erfordert heute umfangreiche serologische und bakteriologische Untersuchungen. Nachdem man sich bis vor wenigen Jahren auf den Ausschluß von Hepatitis A und B sowie von Lues konzentriert hatte [10], ist durch die zunehmende AIDS-Prävalenz ein weiterer Risikofaktor entstanden, da HIV durch die Kältekonservierung des Bankknochens bei den heute üblichen Temperaturen von -70 bis -80°C nicht inaktiviert wird.

Die bislang erste bekannte HIV-Übertragung durch eine allogene Knochentransplantation publizierte das Center for Disease Control im Oktober 1988 [3]. Die HIV-Antikörpertests sind heute zur Diagnostik einer HIV-Infektion die Methode der Wahl. Trotz der hohen Sensitivität der Verfahren besteht die Problematik darin, daß mit diesen Tests nicht der Erreger selbst, sondern nur die Reaktion des Organismus auf die Infektion nachgewiesen werden kann. Es bleibt eine serologische Lücke von Wochen bis unter Umständen Monaten, während der ein Infizierter nicht als HIV-positiv erkannt werden kann [19]. Auch die Durchführung des direkten Erregernachweises bedeutet keinen Gewinn an Sicherheit. HIV führt als Retrovirus zu keiner deutlichen Virämie und ist deshalb mit Antigentests im peripheren Blut nicht sicher nachzuweisen [20]. Wie bei der Herstellung von Plasmaprodukten in der Transfusionsmedizin sollte auch beim Bone Banking durch ein geeignetes Sterilisationsverfahren die Gefahr der HIV-Übertragung ausgeschlossen werden [14].

In dieser Arbeit wird die Eignung der Äthanoldesinfektion und der radioaktiven Bestrahlung für die HIV-Inaktivierung im Rahmen des Bone Banking untersucht.

Die HIV-Inaktivierung durch wäßrige Äthanollösungen ist im Bundesgesundheitsblatt 30 (1987) zusammengefaßt [21]. Alkohollösungen bieten sich aufgrund der geringen Toxizität für die Knochendesinfektion an. Urist verwendete zur Herstellung seines chemosterilisierten Knochens unter anderem ein Methanol-Chloroform-Gemisch. Die besonderen osteoinduktiven Eigenschaften des so behandelten Knochens sind umfassend dargestellt [17]. Tuli lagerte demineralisierten Knochen in 70%igem Äthanol, ohne einen Qualitätsverlust in bezug auf das Einheilungsverhalten festzustellen [16].

Das Hauptproblem der chemischen Desinfektion unentkalkten Knochens ist die Diffusions- bzw. Penetrationsfähigkeit des Desinfektionsmittels. Es ist zu untersuchen, wie tief die jeweilige Lösung in den Knochen eindringen kann und welche Einwirkzeiten für bestimmte Schichtdicken zu veranschlagen sind, damit gewährleistet ist, daß auch die inneren Anteile beispielsweise eines Knochenblocks von dem Desinfektionsmittel erreicht werden. Mit einem Zweikammersystem wurden die Diffusionseigenschaften von 70%igem Äthanol untersucht.

Die radioaktive Bestrahlung erlaubt eine sichere Desinfektion hitzeempfindlicher medizinischer Produkte. Die erforderliche Stahldosis hängt von der Art und dem Ausmaß der Kontamination ab. Es ist zu berücksichtigen, welche Mikroorganismen bzw. Viren inaktiviert werden sollen und mit welcher Häufigkeit sich diese in dem zu behandelnden Produkt befinden. Zur Ermittlung der Strahlenresistenz von HIV wurden Virus-suspensionen mit verschiedenen Dosierungen bestrahlt und auf ihre verbleibende Infektiosität untersucht. Die radioaktive Bestrahlung von Bankknochen wird klinisch in einigen Zentren bereits durchgeführt [7, 9]. Die Arbeitsgruppen von Munting [13] und Glowacki [5] haben zudem gezeigt, daß entkalkter Knochen selbst nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 25 kGy (Gammastrahlung) noch osteoinduktive Eigenschaften besaß.

Material und Methoden

Knochendesinfektion mit 70%igem Äthanol

Als Diffusionskammern fanden VA-Stahlringe Verwendung, in deren Bohrung eine Spongiascheibe mit einer Schichtdicke von 3 mm bzw. 6 mm eingesetzt wurde. Die Abdichtung der Spalträume erfolgte mit einer niedrigviskosen Silikonmasse (Silasoft N). Die Spongiascheibe bildete den Boden des Diffusionsgefäßes (Abbildung 1). 2 ml einer HIV-Suspension mit



Abbildung 1. Diffusionskammer mit Spongiascheibe.

einer reversen Transkriptaseaktivität von 300 000 cpm/ml wurden in das so präparierte Gefäß pipettiert. Nachdem wir die obere Öffnung des Ringes mit Parafilm verschlossen hatten, wurde die Diffusionskammer in einen Tank mit 1500 ml einer 70%igen Äthanollösung gestellt. Die Flüssigkeitsstände des Äthanol und der Virussuspension befanden sich auf gleichem Niveau, um keinen zusätzlichen Druckgradienten durch den Knochen aufzubauen.

Nach 24stündiger Diffusionszeit wurde die HIV-Suspension abpipettiert und von diffundiertem Äthanol freigewaschen. Anschließend wurde eine T-Lymphozyten- sowie eine Makrophagen-Monolayer-Kultur beimpft. Die Zellkulturen wurden täglich auf virusbedingte Zellveränderungen untersucht. Der Nachweis einer HIV-Produktion der Makrophagen als Zeichen verbleibender Infektiosität erfolgte mit dem Abbott-HIV-Antigen-EIA.

Bei gleicher Versuchsanordnung wurden die Diffusionskammern anstatt mit der HIV-Suspension mit 2 ml einer physiologischen Natriumchloridlösung gefüllt. Nach zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden erfolgte eine Probeentnahme zur gaschromatographischen Bestimmung der Äthanolkonzentration in der Diffusionskammer. Für die Schichtdicken 3 mm und 6 mm führten wir eine Serie mit jeweils zehn Diffusionsversuchen durch.

Die verwendeten Spongiosascheiben entstammten humanen Femurköpfen. Mit dem Cloward-Instrumentarium wurde ein Spongiosazylinder in axialer Richtung zum Femurhals ausgesägt. Vom proximalen Ende wurde nach Entfernung der subchondralen Kompakta eine 3 mm sowie eine 6 mm dicke Spongiosascheibe abgesägt. Der Durchmesser der Spongiosascheiben betrug 20 mm.

Radioaktive Bestrahlung

Zur Bestimmung der Strahlenresistenz von HIV wurden Virussuspensionen in einer Elektronenbeschleunigungsanlage und in einer Kobalt-60-Anlage bestrahlt. In der Elektronenbeschleunigungsanlage (Elektronenstrahlung: 2,7 MeV, 3,5 mA) wurden den HIV-Suspensionen Strahlendosen von 2, 7, 10, 15 und 25 kGy appliziert. Mit der Minimaldosis, bei der eine Inaktivierung der Virusproben erreicht wurde, bestrahlten wir eine weitere HIV-Probe in einer Kobalt-60-Anlage (Gammastrahlung). Zur Kontrolle wurde eine Virusprobe zum Bestrahlungsort mitgeführt.

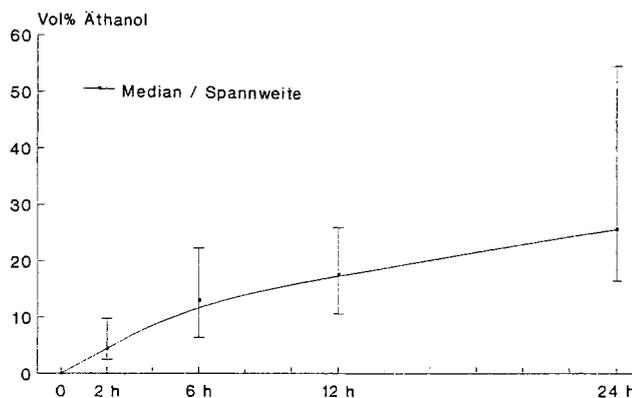


Abbildung 2a. Diffusion einer 70%igen wäßrigen Äthanollösung durch eine Spongiosascheibe (Schichtdicke 3 mm).

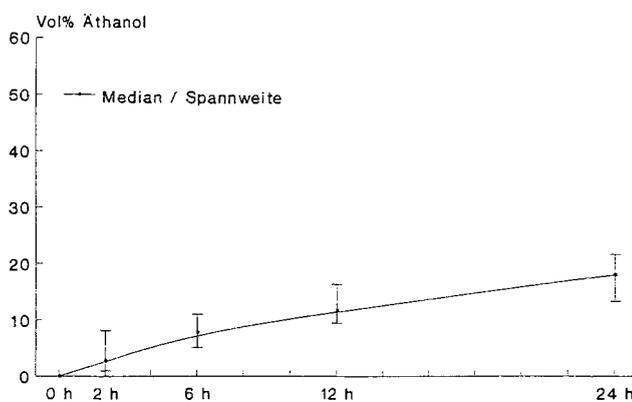


Abbildung 2b. Diffusion einer 70%igen wäßrigen Äthanollösung durch eine Spongiosascheibe (Schichtdicke 6 mm).

Nach der Bestrahlung wurden Makrophagen-Monolayer-Kulturen mit den HIV-Suspensionen beimpft und täglich auf virusbedingte Zellveränderungen untersucht. Der Nachweis einer HIV-Produktion in den Zellkulturen erfolgte ebenfalls mit dem Abbott-HIV-Antigen-EIA.

Ergebnisse

Chemische Desinfektion mit 70%igem Äthanol

Nach 24stündiger Diffusion einer 70%igen Äthanollösung durch 3 mm bzw. 6 mm Spongiosa gegen die Virussuspension erfolgte keine vollständige Inaktivierung der HIV-Suspensionen. Die Ergebnisse des Antigen-tests lagen entsprechend der Testvorschrift für 3 mm und für 6 mm Schichtdicke im positiven Bereich, das heißt, in der Makrophagen-Monolayer-Kultur wurde HIV produziert. In den T-Lymphozyten-Kulturen zeigte die Synzytienbildung ebenfalls eine Infektion mit HIV an (Abbildung 3).

Bei den gaschromatographischen Messungen im zweiten Versuchsteil zeigte sich ein deutlich verzögerter Diffusionsverlauf. Nach einer Diffusionszeit von 24 Stunden

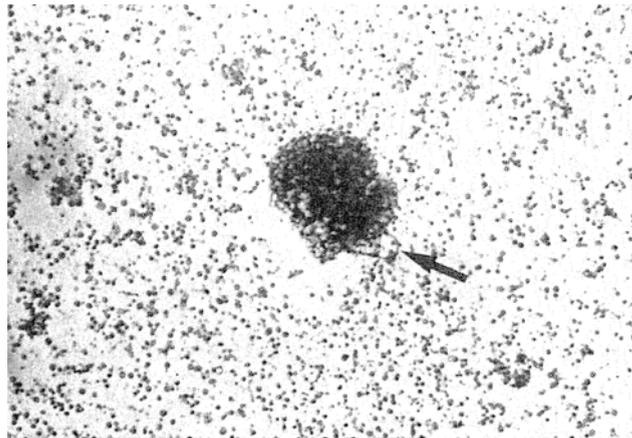


Abbildung 3. Virusbedingte Synzytienbildung in einer T-Lymphozyten-Kultur.

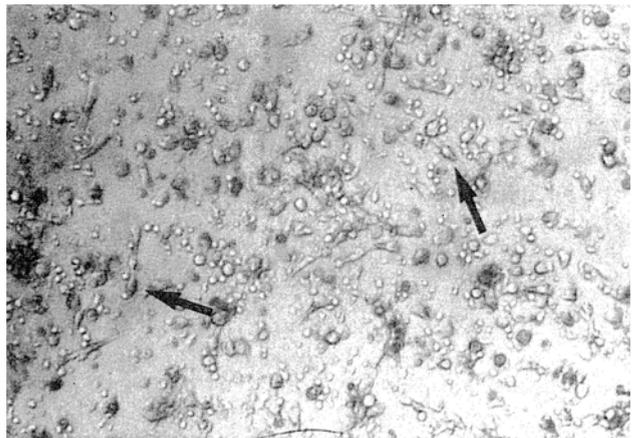


Abbildung 4a. Aktivierte Makrophagen als Zeichen verbleibender Restinfektiosität von HIV (HIV-Suspension vor Beimpfung mit 2 kGy bestrahlt).



Abbildung 4b. Keine morphologischen Veränderungen der Makrophagen (HIV-Suspension vor Beimpfung mit 15 kGy bestrahlt).

den betrug die Äthanolkonzentration im Median bei der Diffusion durch 3 mm Spongiosa 25,6%, bei der Schichtdicke von 6 mm nur 18,0% (Abbildungen 2a und 2b).

Radioaktive Bestrahlung

Nach Applikation von 2, 7 und 10 kGy Betastrahlung konnten mit den bestrahlten HIV-Suspensionen die Makrophagen infiziert werden. Die Doppelbestimmungen zeigten bei den mit 2 und 7 kGy bestrahlten Proben jeweils übereinstimmend positive Werte. Ein Wert der 10-kGy-Probe zeigte die Produktion von Virusantigen in der Zellkultur an. Die mit 15 kGy und mit 25 kGy bestrahlten HIV-Suspensionen konnten die Makrophagen nicht infizieren. Eine Virusproduktion konnte in beiden Fällen nicht nachgewiesen werden. Auch die mit 15 kGy in der Kobalt-60-Anlage bestrahlte HIV-Probe war nicht mehr infektiös (Tabelle 1).

Morphologisch zeigten die Makrophagen, nach der Beimpfung der mit 15 kGy bestrahlten HIV-Suspension keine Zellveränderungen (Abbildung 4b). Die mit 2 kGy bestrahlte HIV-Suspension bewirkte dagegen eine deutliche Aktivierung der Makrophagen (Abbildung 4a).

Diskussion

Aufgrund der untersuchten Diffusionskinetik verbietet sich der Gebrauch einer 70%igen Äthanolösung zur Knochendesinfektion. Nach einer 24stündigen Diffusionszeit konnte das durch eine 3 mm bzw. 6 mm starke Spongiosascheibe diffundierte Äthanol die HIV-

β-Strahlung	2 kGy	0,093	reaktiv
		0,138	reaktiv
	7 kGy	0,116	reaktiv
		0,091	reaktiv
	10 kGy	0,085	
		0,108	reaktiv
	15 kGy	0,073	
		0,079	
	25 kGy	0,071	
		0,077	
γ-Strahlung	15 kGy	0,073	
		0,077	
Kontrolle		0,111	reaktiv
		0,138	reaktiv

Tabelle 1. Abbott-HIV-Antigen EIA. Nach Bestrahlung von HIV erfolgte die Anzucht in Makrophagen-Monolayer-Kulturen (Doppelbestimmung jeder Probe; Extinktionswerte als testinterne Kriterien bei einem Schwellenwert von 0,091).

Suspension nicht inaktivieren. Betrachtet man die Konzentrationswerte bei einer Diffusionsstrecke von 3 mm, so fällt bei den sechs-, zwölf- und 24-Stunden-Werten eine erhebliche Streubreite auf. Die entsprechenden Konzentrationen bei einer Diffusionsstrecke von 6 mm sind deutlich weniger gestreut. Spongiöser Knochen ist ein inhomogener Körper mit amorphen und kristallinen Bestandteilen. Strukturelle Defekte verändern im Fall der kürzeren Diffusionsstrecke einzelne Werte stärker als bei einer längeren Strecke.

Andere Desinfektionslösungen lassen kaum bessere Ergebnisse erwarten. In einem Nebenversuch mit einer 10%igen Glutaraldehydlösung konnte nach 24stündiger Einwirkdauer kein diffundiertes Glutaraldehyd in dem Diffusionsgefäß nachgewiesen werden. Isopropanol besitzt wie andere höhermolekulare Alkohole im Vergleich zu Äthanol eine höhere Viskosität, so daß auch hier keine günstigere Diffusionskinetik zu erwarten ist. Methoden auf der Basis von b-Propiolacton oder eine Gassterilisation mit Äthylenoxyd sollten wegen der erwiesenen Mutagenität beider Substanzen als obsolet gelten [6, 12].

Die radioaktive Bestrahlung dagegen ist ab einer Dosis von 15 kGy eine geeignete Methode, um das Risiko der HIV-Übertragung im Rahmen einer allogenen Knochentransplantation ausschließen zu können. Sowohl mit Elektronenstrahlen als auch mit Gammastrahlen konnte mit dieser Dosis eine HIV-Inaktivierung erzielt werden. Bei unserer Versuchsanordnung konnte aufgrund des geringen Flächengewichtes der Virusproben eine Abschwächung der Elektronenstrahlen vernachlässigt werden. Grundsätzlich aber ist die Verwendung von Gammastrahlen zur Knochenbestrahlung aufgrund der besseren Penetration den Elektronenstrahlen vorzuziehen [1]. Die relativ hohe Strahlendosis von 15 kGy erklärt sich dadurch, daß Viren strahlenresistenter sind als Bakterien, die üblicherweise Ursache einer Kontamination bei der Knochentransplantation sind [4, 18]. Die biomechanischen und die osteoinduktiven bzw. osteokonduktiven Eigenschaften des behandelten Knochens werden hier zum entscheidenden Kriterium. Eigene bisher unveröffentlichte Untersuchungen haben gezeigt, daß ein aggressives thermisches Verfahren wie Autoklavieren bei 134 °C die entscheidenden biomechanischen Parameter deutlich stärker reduziert als eine Bestrahlung mit 25 kGy. Eine HIV-Inaktivierung erfolgt aber bereits ab einer Temperatur von 56 °C [21], so daß auch schonendere Verfahren wie, beispielsweise

eine Knochenpasteurisierung bei 60 bis 80 °C, in Frage kommen. Ein biomechanischer Stabilitätsverlust war bei diesen Temperaturen in unseren Untersuchungen nicht festzustellen. Entsprechende Tierversuche zum Einbauverhalten bestrahlten Knochens werden derzeit durchgeführt und könnten hier insbesondere im Vergleich zu thermisch behandeltem Knochen neue Hinweise ergeben.

Literatur

1. Bright, R., J. Smarsh, V. Gambill: Sterilization of human bone by irradiation. Osteochondral allografts. Little Brown & Co. Boston-Toronto 1987.
2. Bush, L. F.: The use of homogenous bone grafts. A preliminary report on the bone bank. *J. Bone Jt Surg.* 29 (1947), 620-628.
3. CDC: Transmission of HIV through bone transplantation: Case report and public health recommendations. *Münch. med. Wschr.* 37 (1988), 597-599.
4. Doppelt, S., W. Tomford, A. Lucas, H. Mankin: Operational and financial aspects of a hospital bone bank. *J. Bone Jt Surg.* 63-A (1981), 1472-1481.
5. Glowacki, J., L. B. Kaban, J. E. Murray, J. Folkman, J. B. Mulliken: Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet* 8227 (1981), 959-962.
6. Hennings, H., H. C. Smith, N. H. Colburn, R. K. Boutwell: Inhibition by actinomycin D of DNA and RNA synthesis and of skin carcinogenesis initiated by 7,12-dimethylbenzanthracene of b-propiolactone. *Cancer Res.* 28 (1968), 543-552.
7. Hernigou, P., G. Delepine, D. Goutallier: Allogreffes massives cryoconservee et sterilisee par irradiation. *Rev. Chir. Orthop.* 72 (1986), 403-413.
8. Inclán, A.: The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J. Bone Jt Surg.* 24 (1942), 81-96.
9. Komender, J., A. Komender, A. Dziedzic-Goclawska, K. Ostrowski: Radiation-sterilized bone grafts evaluated by electron spin resonance technique and mechanical tests. *Transplant. Proc.* 89 (1976), 25-37.
10. Kuner, E. H., V. Hendrich: Die allogene Knochentransplantation: Indikation-Konservierung-Ergebnisse. *Chirurg* 55 (1984), 704-709.
11. Macewen, W.: Observations concerning transplantation on bone. *Proc. roy. Soc. (Lond.)* 32 (1881), 232.
12. Moeschlin, S.: Klinik und Therapie der Vergiftungen. Thieme, Stuttgart-New York 1986.
13. Munting, E., J. F. Wilmart, A. Wijne, P. Hennebert, C. Delloye: Effect of sterilization on osteoinduction. *Acta. orthop. scand.* 59 (1988), 34-38.
14. Stephan, W., H. Dichtelmüller: Inactivation of retroviruses by b-propiolactone. *Lancet* 5 (1985), 56.
15. Tomford, W., R. Starkweather, H. Goldman: A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J. Bone Jt Surg.* 63-A (1981), 244-248.
16. Tuli, S. M., A. D. Singh: The osteoinductive property of decalcified bone matrix. *J. Bone Jt Surg.* 60-B (1978), 116-123.
17. Urist, M. R., A. Mikulski, S. D. Boyd: Chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. *Arch. Surg.* 110 (1975), 416-428.

18. Wallhäuser, G.: Praxis der Sterilisation–Desinfektion–Konservierung. Thieme, Stuttgart–New York 1987.
19. Werner, A., H. R. Brodt, G. Wangenheim, R. Kurth, E. B. Helm: Klinischer Verlauf und serologische Parameter bei einer akuten HTLV-III/LAV-Infektion. AIFO (1986), 26–30.
20. Winkler, C., M. E. Cornely, M. Johann: AIDS. Eine aktuelle Übersicht. Bayer, Leverkusen 1989, S. 1–70.
21. Zeichhardt, H., N. Scheiermann, G. Spicher, F. Deinhardt: Stabilität und Inaktivierung des HIV. Bundesgesundheitsbl. 30 (1987), 172–177.

Für die Verfasser: PD Dr. Harald Knaepler, Klinik für Unfallchirurgie, Klinikum der Philipps-Universität, Baldingerstraße, D-3550 Marburg.